

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 10-248572

(43) Date of publication of application : 22.09.1998

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C07H 21/04
C12N 1/21
C12N 9/02
C12Q 1/26
//(C12N 15/09
C12R 1:06)
(C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12N 9/02
C12R 1:19)

(21) Application number : 09-055203

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22) Date of filing : 10.03.1997

(72)Inventor : NISHIYA YOSHIAKI
KAWAMURA YOSHIHISA

(54) MODIFIED SARCOSINE OXIDASE AND ITS USE

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To prevent the occurrence of positive errors in measuring creatine and creatinine for diagnoses of muscle diseases and renal diseases by reducing reactivity to proline by modifying a protein having sarcosine oxidase activity using a protein engineering method.

SOLUTION: Reactivity of a natural sarcosine oxidase to proline is reduced by a method, etc., in which the 345th phenyl alanine in the amino acid sequence of the formula as a protein having sarcosine oxidase activity, is substituted with alanine, glycine, valine or isoleucine.

Met Ser Ile Ile Tyr Asp Val	Asp Val Val Gly Asp Gly Ser
I	I
	10
	15
Asp Gly Met Ala Ala Gly Tyr Leu Ser Iys Glu Cys Val Iys Ile	
20	25
	30
Leu Leu Val Asp Ser Phe Leu Tyr Pro Glu Thr Asp Gly Ser Ile Ile	
35	40
	45
Gly Asp Thr Arg Ile Tyr Asp Ile Ile Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Ile	
50	55
	60
Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Glu Ile Leu Ile Tyr His Leu Cys Ile	
65	70
	75

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

13.05.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-248572

(43)公開日 平成10年(1998)9月22日

(51)Int.CL ⁶	識別記号	P I	
C 12 N 15/09	ZNA	C 12 N 15/00	ZNAA
C 07 H 21/04		C 07 H 21/04	B
C 12 N 1/21		C 12 N 1/21	
9/02		9/02	
C 12 Q 1/26		C 12 Q 1/26	

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 12 頁) 専用頁に統べ

(21)出願番号	特願平9-55203	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成9年(1997)3月10日	(72)発明者	西矢 芳昭 福井県敦賀市東岸町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72)発明者	川村 厳久 福井県敦賀市東岸町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(54)【発明の名稱】 改変ザルコシンオキシダーゼおよびその用途

(57)【要約】 (修正有)

【課題】蛋白工学的手法によるプロリンに対する反応性が低下した改変ザルコシンオキシダーゼの遺伝子操作技術による大量生産方法及びクレアチニン測定試薬としての利用方法の提供。

【解決手段】ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変異させた蛋白質であって、プロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下したものであることを特徴とする改変ザルコシンオキシダーゼおよびその製法ならびに該酵素を使用するクレアチニンまたはクレアチニン測定試薬。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変異させた蛋白質であって、プロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下したものであることを特徴とする改変ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項2】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸が、他のアミノ酸に置換してなる請求項1記載の改変ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項3】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第345番目のフェニルアラニンが、他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列(配列表の配列番号2)を有する蛋白質である請求項2記載の改変ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項4】 他のアミノ酸がアラニン、グリシン、バリンあるいはイソロイシンである請求項3記載の改変ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項5】 下記理化学的性質を有する改変ザルコシンオキシダーゼ。

作用: 水および酸素の存在下にザルコシンに作用して、グリシン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

至適pH: 7.5~8.5

至適温度: 40~50°C

安定pH: 6.5~9.0 (25°C, 24時間処理)

安定温度: 50°C以下 (pH 7.5, 10分間処理)

基質特異性: プロリンに対する反応性が、改変前のタンパク質に比べて、70%以下である。

分子量: 約43KDa

アミノ酸配列: 配列表の配列番号2に記載される。

【請求項6】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を他のアミノ酸をコードする遺伝子にて置換した遺伝子を組み込んだ発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、該培養物からプロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下した改変ザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変ザルコシンオキシダーゼの製造法。

【請求項7】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第345番目のフェニルアラニンをコードする遺伝子を他のアミノ酸をコードする遺伝子に置換した請求項6記載の改変ザルコシンオキシダーゼの製造法。

【請求項8】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を他のアミノ酸をコードする遺伝子にて置換した遺伝子が、配列表の配列番号4に記載されるDNA配列である請求項6記載の改変ザルコシンオキシダーゼの製造法。

【請求項9】 請求項1~5のいずれか1項に記載され

るプロリンに対する反応性が改変前のタンパク質に比して低下した改変ザルコシンオキシダーゼ、クレアチニアミジノヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼおよび過酸化水素検出試薬を含むクレアチニン測定用試薬。

【請求項10】 請求項1~5のいずれか1項に記載されるプロリンに対する反応性が改変前のタンパク質に比して低下した改変ザルコシンオキシダーゼ、クレアチニアミジノヒドロラーゼ、クレアチニアミジノヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼおよび過酸化水素検出試薬を含むクレアチニン測定用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】 本発明は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白工学的手法により改変することにより得られる、プロリンに対する反応性が改変前の野生型ザルコシンオキシダーゼ、および該酵素の製造法およびその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来から、ザルコシンオキシダーゼ(EC 1.5.3.1)は、臨床的に筋疾患、腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチニン、クレアチニンの測定用酵素として、他の酵素、例えばクレアチニアミドヒドロラーゼ、クレアチニアミジノヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼと共に使用されている。ザルコシンオキシダーゼはその基質であるザルコシンに水、酸素の存在下で作用して、グリシン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

【0003】 このようなザルコシンオキシダーゼは、バチルス属(特開昭54-52789号公報)、コリネバクテリウム属(J. Biochem. 89, 599 (1981))、シリンドロカルボン属(特開昭56-92799号公報)、シュードモナス属(特開昭60-43379号公報)等の細菌が生産することが知られている。とりわけ、アースロバクター・エスピーテ E 1826 (FERM P-10637)の生産するザルコシンオキシダーゼは、従来のザルコシンオキシダーゼよりも熱安定性に優れ、かつ、Km値の小さい実用的な酵素であることが既に知られている(特開平2-265478号公報)。

【0004】 本発明者らは、既に、アースロバクター・エスピーテ E 1826 (FERM P-10637)より抽出した黄色体DNAよりザルコシンオキシダーゼ遺伝子の単離に成功し、そのDNAの全構造を決定し(Journal of Fermentation and Bioengineering 61, 75 No.4 pp239-244 (1993))、該ザルコシンオキシダーゼを遺伝子工学的手法によって形質転換体に高生産させることに成功し、高純度なザルコシンオキシダーゼを安価に大量供給することを可能にしている(特開平6-113840号公報)。

【0005】 しかしながら、ザルコシンオキシダーゼはアミノ酸の1種であるプロリンにも低いレベルではあるが、反応性を示すことが知られている(例えば、特開平

5-115281号公報)。しかし、プロリン、特にL-プロリンは生体を構成する蛋白質の1成分であり、体液中に存在する可能性があるため、体液中のクレアチニン、クレアチニンの測定の際に正確差を生じる原因となり得る。実際、大澤らはクレアチニン測定用試薬における問題点として、該試薬中に含まれるザルコシンオキシダーゼのプロリンに対する反応性を挙げている(例えば臨床科学、20,144-152(1991)、生物試料分析、17,332-337(1994)参照)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】従って、野生型ザルコシンオキシダーゼのプロリンに対する反応性を低下させることができていた。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するために種々検討した結果、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白工学的手法により改変することで、プロリンに対する反応性が野生型ザルコシンオキシダーゼに比べて低下した改変ザルコシンオキシダーゼを造成することが可能であることを見いだした。

【0008】すなわち、本発明は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変異させた蛋白質であって、プロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下したものであることを特徴とする改変ザルコシンオキシダーゼである。

【0009】また、本発明は配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を他のアミノ酸をコードする遺伝子にて置換した遺伝子を組み込んだ発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、該培養物からプロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下した改変ザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変ザルコシンオキシダーゼの製造法である。

【0010】さらに、本発明は上記プロリンに対する反応性が改変前のタンパク質に比して低下した改変ザルコシンオキシダーゼ、クレアチニンアミジノヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼおよび過酸化水素検出試薬を含むクレアチニン測定用試薬である。

【0011】また、本発明は上記プロリンに対する反応性が改変前のタンパク質に比して低下した改変ザルコシンオキシダーゼ、クレアチニンアミジドヒドロラーゼ、クレアチニンアミジノヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼおよび過酸化水素検出試薬を含むクレアチニン測定用試薬である。

【0012】

【発明の実施態様】本発明の改変される前のザルコシンオキシダーゼとしては、特に限定されるものではないが、例えば、バチルス属由来のザルコシンオキシダーゼ、シュードモナス属由来のザルコシンオキシダーゼな

どが挙げられる。

【0013】本発明ではその1例として、アースロバクター・エスピー・TE 1826 (FERIP-10637)のザルコシンオキシダーゼ(特開平2-265478号公報、特開平6-113849号公報、Journal of Fermentation and Bioengineering Vol.75 No.4 pp239-244 (1993)に記載)を用いた。アースロバクター・エスピー・TE 1826由来のザルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列を、配列表の配列番号1に示す。また、これらのアミノ酸配列をコードするDNA配列を、配列表の配列番号3に示す。

【0014】本発明の改変ザルコシンオキシダーゼは、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変異させた蛋白質であって、プロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下したものである。プロリンに対する反応性とは、本来の基質であるザルコシンを基質とした際の酵素活性に対する、プロリンを基質とした酵素活性の割合として定義される。本発明ではプロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下したものであるが、その低下の程度は、約70%以下である。

【0015】本発明の一実施態様としては、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸が、他のアミノ酸に置換してなる改変ザルコシンオキシダーゼがある。

【0016】さらに、本発明の一実施態様としては、配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第345番目のフェニルアラニンが、他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列(配列表、配列番号2)を有する蛋白質である。

【0017】また、本発明の一実施態様としては、他のアミノ酸がアラニン、グリシン、バリンあるいはイソロイシンである改変ザルコシンオキシダーゼがある。

【0018】さらに、具体的な実施態様としては下記理化学的性質を有する改変ザルコシンオキシダーゼがある。

作用:水および酵素の存在下にザルコシンに作用して、グリシン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

至適pH: 7.5~8.5

至適温度: 40~50°C

安定pH: 6.5~9.0 (25°C, 24時間処理)

安定温度: 50°C以下 (pH 7.5, 10分間処理)

基質特異性: プロリンに対する反応性が、改変前のタンパク質に比べて、70%以下である。

分子量: 約43 kDa

アミノ酸配列: 配列表の配列番号2に記載される。

【0019】本発明の改変ザルコシンオキシダーゼは、以下に示す手順で製造することが可能である。まず、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するア

5

ミノ酸配列を改変する方法としては、通常、行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作成される。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット（Transformer™ ; Clonetech 製、EXOIII/Mung Bean Deletion Kit ; Stratagene 製）などを使用するか、またはPCRの利用が挙げられる。

育し、改変蛋白質を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH 6.0~9.0程度である。

〔0023〕培養物中の改変蛋白質を生産する菌体を含む培養液を、そのまま採取し利用することもできるが、一般には常法に従って、改変蛋白質が培養液中に存在する場合は通過、遠心分離などにより、改変蛋白質含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。改変蛋白質が菌体内に存在する場合には、得られた培養物から通過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾームなどの酵素的方法で破壊し、また必要に応じて EDTA 等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加して改変蛋白質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

〔0024〕このようにして得られた改変蛋白質含有溶液を、例えば減圧濃縮、臘過、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等温点処理も有効な精製手段である。吸着剤或いはゲル過剤などによるゲル過過、吸着クロマトグラフ

BEST AVAILABLE COPY

下のように行なった。すなわち、48 mMトリス-HCl緩衝液(pH8.0)、9.5 mMザルコシン、0.47 mM4-アミノアンチビリン、2.0 mMフェノール、0.045%トリトンX-100、4.5 U/mgペルオキシダーゼ中で、酵素を37°C、10分反応させ、500 nmにおける吸光度を測定する。酵素活性の1単位(U)は、この条件下で1分間当たり1マイクロモルの過酸化水素を生成する酵素量とした。また、L-プロリンに対する反応性は、上記組成中のザルコシンをL-プロリンに置き換えた際の活性の相対比として測定した。

【0028】実施例1 ザルコシンオキシダーゼの改変ザルコシンオキシダーゼの遺伝情報を有する組換え体プラスミド、pSACEP3をジャーナル・オブ・ファーメンテーション・アンド・バイオエンジニアリング(Journal of Fermentation and Bioengineering) Vol.75 No.4 pp239-244(1993)に記載の方法に従い、以下のようにして調製した。まず、アースロバクター・エスピー-TE1826(FERM P-10537)の染色体DNAを次の方法で分離した。同菌株を100 mlの2×YT培地(1.6%ポリベブトン、1%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム(pH7.2))で37°C一晩振盪培養後、遠心(8000 rpm、10分)により集菌した。1.5 mMクエン酸ナトリウム、0.15 M塩化ナトリウムを含んだ溶液5 mlに懸滴させ、0.5 mlのリゾチーム溶液(100 mg/ml)を加えて、37°C、30分間保温した。次いで1 mlの1%ラウロイルザルコシン酸、0.1 M EDTA(pH9.5)を含む溶液を加えた。

【0029】この懸滴液に臭化エチジウム溶液を0.5%塩化セシウムを約100%加え、振拌混台し、55,000 rpm、20時間の超遠心でDNAを分取した。分取したDNAは、10 mMトリス塩酸(pH8.0)、1 mM EDTAを含んだ溶液(TE)で透析し、精製DNA標品とした。

【0030】精製DNA標品1 μgを制限酵素Sau3AI(東洋紡製)で部分分解反応させ、2 kb以上の大断片に分解した後、SalIII(東洋紡製)で切断した、pUC180.5 μgを用い、M.G.LoftusらのBACKFILLING法(BioTechniques Vol.12, No.2(1992))に従い、T4-DNAリガーゼ(東洋紡製)1ユーニットで16°C、12時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAは、Hannahの方法により作成したエシェリヒア・コリー-JK109のコンビテントセルを用いて形質転換した。使用したDNA 1 μg当たり約1×10⁸個の形質転換体のコロニーが得られた。得られたコロニーは50 μg/mlアンビシリン、0.5%ザルコシン、0.005%ラロースアニリンおよび0.02%ソディウムハイドロジフェンザルファイト入りし培地(1%ポリベブトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム)で37°C、18時間培養し、赤色コロニーを指標にザルコシンオキシダーゼ遺伝子の入った組換え

DNAをスクリーニングした。

【0031】その結果、約1,000個のコロニーのうち1株の割合で赤色を示すコロニーを得た。この中の1株が保有するプラスミドには約8.7 kbの挿入DNA断片が存在しており、このプラスミドをpSA01とした。次いでpSA01より挿入DNA断片を様々な制限酵素により切断してpUC18にサブクローニングし、約1.7 kbの挿入DNA断片を有するpSACEP3を得た。

【0032】配列表の配列番号3にpSACEP3の挿入DNA A断片のDNA配列を、配列表の配列番号1にpSACEP3の挿入DNA断片中にコードされているザルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列をそれぞれ記載している。該組換えプラスミドpSACEP3を基に、配列表の配列番号5のオリゴヌクレオチドとDNA中の塩基を変換するキットであるTransformerTM(Clontech製)を用い、TransformerTMのプロトコールに従い、変異処理操作を行った。その結果、配列表の配列番号1記載の第345番目のフェニルアラニンがアラニンに置換された改変蛋白質F345A(配列表の配列番号2記載)の遺伝情報を有するDNA Aを保持するプラスミドを作成した。

【0033】該改変ザルコシンオキシダーゼの遺伝情報を有するDNAを複数の制限酵素で切断してサブクローニングを調製し、通常に従い、シーケンシング・キット(SEQUENCING PRO 7-deaza-dGTP kit、東洋紡製)を用いて塩基配列を決定し、改変されていることを確認した。該改変ザルコシンオキシダーゼの遺伝情報を有するDNAを保持する組換え体プラスミドでエシェリヒアコリー-JK109のコンビテントセルを形質転換し、形質転換体をそれぞれ得た。

【0034】実施例2 形質転換体の培養と改変蛋白質の精製
2×YT培地(1.6%ポリベブトン、1%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム(pH7.2))50 mlを500 mlフラスコに分注し、121°C、15分間オートクレーブを行い放冷後、別途無菌通過した50 mg/mlアンビシリン(ナカライテスク製)を0.1%添加した。この培地に上記と同一組成の培地で、予め37°Cで18時間振盪培養した形質転換体の培養液1 mlを接種し、37°Cで通常振盪培養した。

【0035】培養液より改変蛋白質を、ジャーナル・オブ・ファーメンテーション・アンド・バイオエンジニアリング(Journal of Fermentation and Bioengineering) Vol.75 No.4 pp239-244(1993)記載のザルコシンオキシダーゼの精製法に従い、超音波破碎、除核酸処理、硫酸アンモニウム塩析、DEAE-Sephadexカラムクロマトグラフィー、ゲル通過カラムクロマトグラフィーの工程を順次実施し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて单一のバンドを形成するまで精製した。

【0036】実施例3 改変蛋白質の評価
50 精製された改変ザルコシンオキシダーゼと野生型ザルコ

9 シンオキシダーゼの、L-プロリンに対する反応性をザルコシンに対する反応性を比較した。その結果を表1に示す。

10

* [0037]

【表1】

*

ザルコシンオキシダーゼ	活性相対比(%)	
	ザルコシン	L-プロリン
野生型	100	0.95
改変蛋白質(F345A)	100	0.66

[0038] 表1から明らかのように、改変ザルコシンオキシダーゼ F345AのL-プロリンに対する反応性は、野生型ザルコシンオキシダーゼのL-プロリンに対する反応性より低下していることを示している。また、ザルコシンに対する絶対的な反応性を表す比活性は、野生型ザルコシンオキシダーゼが約20U/mgであるのに対し、改変ザルコシンオキシダーゼ F345Aは約18U/mgとなつてほとんど遜色なかった。すなわち、改変ザルコシンオキシダーゼは絶対的な酵素性能をほとんど損なうことなく、L-プロリンに対する反応性が野生型ザルコシンオキシダーゼより低下していることが明らかとなつた。なお、他の性質は野生型ザルコシンオキシダーゼとほぼ、同じ性質であった。

[0039]

【発明の効果】本発明によって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白工学的手法を用いて改変し、プロリンに対する反応性が低下した改変ザルコシンオキシダーゼを供給することが可能となった。本発明の改変ザルコシンオキシダーゼは、細菌の系での遺伝子操作※

※作技術による大量生産を実現することができる。また、本発明の改変ザルコシンオキシダーゼを臨床的に筋疾患、腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチニン、クレアチニンの測定用酵素として、プロリンの影響を受けることなく、検体中のクレアチニン、クレアチニンの量を正確、迅速に測定するために使用することができる。

【0040】

【配列表】

20 配列番号：1

配列の長さ：389

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

起源

生物名：アースロバクター・エスピー(Arthrobacter S P.)

株名：TE1826

配列

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr
 20 25 30
 Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His
 35 40 45
 Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr
 50 55 60
 Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Thr Tyr Glu Leu Glu Lys
 65 70 75 80
 Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
 85 90 95
 Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
 100 105 110
 Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys
 115 120 125
 Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu
 130 135 140
 Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg
 145 150 155 160

11

12

Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val
 155 170 175
 Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr
 180 185 190
 Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn
 195 200 205
 Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr
 210 215 220
 Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn
 225 230 235 240
 Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr
 245 250 255
 Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His
 260 265 270
 Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly
 275 280 285
 Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
 290 295 300
 Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
 305 310 315 320
 Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe
 325 330 335
 Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
 340 345 350
 Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
 355 360 365
 Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
 370 375 380
 Gln Lys Glu Thr Ile
 385 389

【0041】配列番号：2

* X & a はフェニルアラニン以外のアミノ酸を示す。

配列の長さ：389

起源

配列の型：アミノ酸

生物名：アースロバクター・エスピー (Arthrobacter S

トボロジー：直鎖状

P.)

配列の種類：蛋白質

株名：TE1826

他の情報：

*

配列

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr
 20 25 30
 Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His
 35 40 45
 Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr
 50 55 60
 Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
 65 70 75 80
 Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
 85 90 95
 Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys

BEST AVAILABLE COPY

(8)

特開平10-248572

13

14

100	105	110
Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys		
115	120	125
Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu		
130	135	140
Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg		
145	150	155
Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val		
165	170	175
Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr		
180	185	190
Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn		
195	200	205
Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr		
210	215	220
Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn		
225	230	235
Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr		
245	250	255
Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His		
260	265	270
Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly		
275	280	285
Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr		
290	295	300
Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr		
305	310	315
Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe		
325	330	335
Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Xaa Ser Gly His Gly Phe Lys Phe		
340	345	350
Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys		
355	360	365
Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys		
370	375	380
Gln Lys Glu Thr Ile		
385	390	

【0042】配列番号：3

* 配列の種類：genomic DNA

配列の長さ：1670

起源

配列の型：核酸 (DNA)

40 生物名：アースロバクター・エスピー (Arthrobacter S

鎖の数：二本鎖

P.)

トポロジー：直鎖状

* 株名：TE 1826

配列

CTGCAGTTCT TCTTCAACTT TTTCATCTT CACGGTAACA TAAGATTGAA CATAATTAA 60
 ACTTTTGCCG CCCTTGTAAA CGCTGCCATA TTCAACTTAC TTTTCAAAAA TCTGCAAATC 120
 TTAAATTCCC AACTATAATC ACTCCAAAAA CGTTCTTTTA CTACTACAC TAGAATATT 180
 CTAAAGCTGA TAQQCTCTAT CACTTTAACG CATTTTACAT GATGCCAAT AGCCCCGTATG 240
 ATGTAATAG ATAATTAAGA AAATTCAAAT TAQCTGTGTT AAAAAGGAGA CGAAAACA 297
 ATG AGT ATT AAA AAA CAT TAT GAT GTA ATT GTG GTT CCC GCT GGT TCC 345
 Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser

BEST AVAILABLE COPY

(9)

特期平10-248572

15

16

1	5	10	15	393
ATG GCA ATG GCA CCT CGG TAC TAT CTG TCT AAA CAA CGT GTT AAA ACA				
Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr				
20	25	30		
CTA TTG GCA GAT TCA TTT CAT CCT CCC CAT ACA AAT CGC AGC CAT CAT				441
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His				
35	40	45		
GCC GAT ACA CGG ATC ATT CGT CAC GCA TAT CGC GAA CGA AGA GAG TAT				489
Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr				
50	55	60		
GTA CGG TTT CGC TTG AGA CCA CAA GAG TTA TCG TAT GAA TTA GAA AAG				537
Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys				
65	70	75	80	
GAG ACT CAT CAT AAA ATA TTT ACA AAA ACA CGT GTC CTC GTT TTT CGT				585
Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly				
85	90	95		
CCT AAA CGA GAA CCT CCT TTG GTC GAA ACA ATG CAA CGC GCA AAG				633
100	105	110		
CAA CAT TCA TTA GAT GTT GAT TTA CTA GAA CGA AGT GAA ATA AAT AAG				681
Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys				
115	120	125		
CGT TGG CCA CGT GTC AGC GTT CCT GAG AAT TAT AAT CCT ATT TTT GAA				729
Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu				
130	135	140		
AAA AAT TCT CGT GTC TTA TTT AGT GAA AAT TGT ATT CGC CCT TAC CGT				777
Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg				
145	150	155	160	
GAA TTG CGG GAA CGA AAT CGT CGG AAA GTT CTC AGC TAC ACA CCC GTT				825
Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val				
165	170	175		
GAA GAT TTC GAG ATT CGC GAG GAC TTC GTC AAA ATC CAA ACC CGC TAT				873
Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr				
180	185	190		
GCG TCC TTT ACA CGC AGT AAA TTA ATT GTT AGC ATG CGC CCT TGG AAT				921
Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn				
195	200	205		
AGC AAA CTG CTA TCA AAA TTA AAT ATT GAA ATC CCA TTG CAG CCA TAC				959
Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr				
210	215	220		
CGT CAA GTT GTC GGA TTC TTC GAA TGT GAT GAA AAA AAA TAT AGC AAT				1017
Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn				
225	230	235	240	
ACA CAT CGT TAT CGG CGG TTC ATG GTC GAA GTC CCA ACT CGC ATC TAT				1065
Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr				
245	250	255		
TAC GCA TTT CCA AGC TTC CGC CGC TGG AAA ATA CGC TAT CAT				1113
Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His				
260	265	270		
ACG TAT CGT CAA AAA ATC GAT CCA GAT ACC ATT AAT CGT GAA TTT CGT				1151
Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly				

BEST AVAILABLE COPY

(10)

特開平10-248572

17

18

275

280

285

ATT TAC CGG GAG CAT GAA GCG AAT ATT CCC AAA TTC CTG GAA ACA TAT 1209
Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr

290

295

300

ATG CGG CGA GCA ACC GCG GAA TTA AAA AGT CGG GCA GTT TGC ATG TAC 1257
Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr

305

310

315

320

ACA AAA ACA CCT GAT GAG CAT TTC GTG ATT CAT TTA CAT CCT CAA TTC 1305
Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe

325

330

335

TCG AAT GTC CGG ATT GCA GCG GGA TTC TCC CGA CAT CGG TTT AAA TTC 1353
Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe

340

345

350

TCA AOC GTA GTT CGT GAA ACA TTA AGT CAA TTA OCT GTA ACC CGT AAA 1401
Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys

355

360

365

ACA GAA CAC GAT ATT TCC ATC TTT TCA ATC AAT CGC CCT CCT TTA AAA 1449
Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys

370

375

380

CAA AAA GAA ACG ATT TAAAAAGCGA AGCAAGCGT ACATAAATTG CGATAGATAT 1504
Gln Lys Glu Thr Ile

385

TATGTACGCC TTACTTTTATT TACAACCTAA AAATCTGGAT ATCAAATCGT TCCCTCTACT 1564G
ATTGAAGCA CAAACTGTAC TTGAAAGCGT TTTTTATTAA CTGTAAGGA TAACAGGAAC 1624CC
TAAATAAA GAAGACCGT CGATAAGAT AGTACGGGAG GAATTG 1670

【0043】配列番号：4

* 生物名：アースロバクター・エスピー(Arthrobacter S

配列の長さ：1670

P.)

配列の型：核酸(DNA)

株名：TE1826

鎖の数：二本鎖

他の情報：

トポロジー：直鎖状

39 NはA又はC又はG又はTもしくはUを示す。

配列の種類：genomic DNA

Xaaはフェニルアラニン以外のアミノ酸を示す。

起源

*

配列

CTCCAGTTCT TCCCTCAGCT TTGATCCTT CACGGTAACA TAAGATTGAA CATAATTAA 60
ACTTTTGGCC CGCTTTGAAA CGCTCCATAA TTCAACTACC TTGATGAAAAA TCTGCGAAATC 120TTAATTTCCTT AAGTATAATC ACTCCAAAAA CGTTCTTTTA CTACTAGGAC TAGAATATT 180
CTAAAGTGA TAGCTGCTT CACTTTAAAG CATTTCAT GATGGCCAT AGGGCGTATG 240ATGTAATTAAG ATAATTAAGA AAATTCAAAT TACCTGTTG AAAAGGAGA CGAAACA 297
ATG AGT ATT AAA AAA GAT TAT GAT GAA ATT GTG GTT GGC CCT GGT TCC 345Met Ser Ile Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
1 5 10 15ATG GCA ATG GCA CCT CGG TAC TAT CTG TCT AAA CAA CGT GTT AAA ACA 393
Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr20 25 30
CTA TTG GCA GAT TCA TTT CAT CCT CCC CAT ACA AAT GCG AGC CAT CAT 441
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His35 40 45
GCG GAT ACA CGG ATC ATT CGT CAC GCA TAT GCG GAA GCG AGA GAC TAT 489
Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr

50

55

60

BEST AVAILABLE COPY

19

20

GTC CCC TTT GGC TTG AGA GCA CAA GAG TTA TGG TAT GAA TTA GAA AAG 537
 Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
 65 70 75 80
 CAG ACT CAT CAT AAA ATA TTT ACA AAA ACA CCT GTC CTC GTT TTT CCT 585
 Glu Thr His His Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
 85 90 95
 CCT AAA GCA GAA GCT CCT TTC GTT GGC GAA ACA ATG GAA GCA GCA AAG 633
 Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
 100 105 110
 GAA CAT TCA TTA GAT GTT GAT TTA CTA GAA GCA AGT GAA ATA AAT AAG 681
 Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys
 115 120 125
 CGT TGG CCA CGT GTC AGC GTT CCT GAG AAT TAT AAT CCT ATT TTT GAA 729
 Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu
 130 135 140
 AAA AAT TCT GGT GTC TTA TTT AGT GAA AAT TGT ATT CCC GCT TAC CGT 777
 Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg
 145 150 155 160
 CAA TTC GCG GAA GCA AAT CCT GCG AAA GTT CTA AGC TAC ACA CCC GTT 825
 Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val
 165 170 175
 CAA GAT TTC GAG ATT CCT GAG GAC TTC GTC AAA ATC CAA ACC GGC TAT 873
 Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Glu Gln Thr Ala Tyr
 180 185 190
 CCT TCC TTT ACA GCG AGT AAA TTA ATT GTT AGC ATG GGC CCT TGG ATT 921
 Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn
 195 200 205
 ACC AAA CTG CTA TCA AAA TTA AAT ATT GAA ATC CCA TGG CAG CCA TAC 969
 Ser Lys Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr
 210 215 220
 CGT CAA GTT GTC GGA TTC TGC GAA TGT GAT CAA AAA AAA TAT AGC AAT 1017
 Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn
 225 230 235 240
 ACA CAT CGT TAT CCT CGG CGG TTC ATG GTC GAA GTC CCA ACT GGC ATC TAT 1065
 Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr
 245 250 255
 TAC GCA TTT CCA ACG TTC GGC GGC TGC GGC TGC AAA ATA GGC TAT CAT 1113
 Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His
 260 265 270
 AGC TAT CCT CAA AAA ATC GAT CCA GAT AGC ATT AAT CCT GAA TTT CCT 1161
 Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly
 275 280 285
 ATT TAC CGG GAG GAT GAA CGG AAT ATT CCT AAA TTC CTG GAA ACA TAT 1209
 Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
 290 295 300
 ATG CGG CGA GCA ACC GGC GAA TTA AAA AGT CGG GCA GTT TGC ATG TAC 1257
 Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
 305 310 315 320
 ACA AAA ACA CCT GAT GAG CAT TTC GTG ATT CAT TTA CAT CCT CAA TTC 1305
 Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe

BEST AVAILABLE COPY

(12)

特開平10-248572

21

22

325	330	335
TCG AAT GTC CGG ATT GCA GCG CGA NNN TCC CGA CAT CGG TTT AAA TTC		1353
Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Xaa Ser Gly His Gly Phe Lys Phe		
340	345	350
TCA ACC GTC GTT GGT GAA ACA TTA AGT CAA TTA CCT GTC ACC CGT AAA		1401
Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys		
355	360	365
ACA GAA CAC GAT ATT TCC ATC TTT TCA ATC AAT CGC CCT CCT TTA AAA		1449
Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys		
370	375	380
CAA AAA GAA AGC ATT TAAAAACCCA AGCAAGCCGT ACATAAAATTG CGATAGATAT		1504
Gln Lys Glu Thr Ile		
385		
TATGTACGGC TTACTTTATT TACAACTTAA AAATCTGGAT ATCAATCTG TCCCTCTACT		1564
GATTGAACCA CAAACTGTAC TTGAACGGCT TTTTTATTAA CTTGTAACGA TAACAGGAAC		1624

フロントページの続き

(51)Int.Cl.° 譲別記号 F I
//(C 12 N 15/09 2 NA
C 12 R 1:06
(C 12 N 1/21
C 12 R 1:19
(C 12 N 9/02
C 12 R 1:19)

BEST AVAILABLE COPY